





A-protein as diagnostic of cancer**Publication number:** CN1168176**Publication date:** 1997-12-17**Inventor:** SCHMIDT GEOFFREY J (US); HOFFMAN KENNETH L (US)**Applicant:** SCHEPENS EYE RES INST (US)**Classification:****- International:** G01N33/53; C07K16/30; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/574; G01N33/577; C12R1/91; G01N33/53; C07K16/18; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/574; G01N33/577; (IPC1-7): G01N33/574; C07K16/30; G01N33/577**- European:** C07K16/30; G01N33/574V**Application number:** CN19961091397 19960111**Priority number(s):** US19950370969 19950110**Also published as:** WO9621862 (A1)
 EP0803065 (A1)
 EP0803065 (A0)
 EP0803065 (B1)**Report a data error here**

Abstract not available for CN1168176

Abstract of corresponding document: **WO9621862**

The presence of A-protein in an abnormally large amount in a sample, such as blood, from an individual is diagnostic of primary or metastatic cancer in the individual. The presence of A-protein is most readily detected by immunological reaction of it with specific antibodies. A preferred procedure for detecting the presence of A-protein in samples is by a sandwich assay using two antibodies with different epitopic specificities for A-protein.

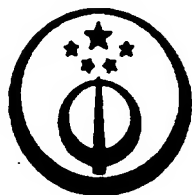
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

G01N 33/574

G01N 33/577 C07K 16/30



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96191397.5

[43]公开日 1997 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 1168176A

[22]申请日 96.1.11

[30]优先权

[32]95.1.10 [33]US[31]08/370,969

[86]国际申请 PCT/US96/00098 96.1.11

[87]国际公布 WO96/21862 英 96.7.18

[85]进入国家阶段日期 97.7.10

[71]申请人 司科彭斯眼部研究学会

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 希恰公司

[72]发明人 杰弗里·J·司克米德

肯尼斯·L·霍夫曼

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 以蛋白质A对癌症的诊断

[57]摘要

本发明揭示了病患者的样品中,例如,血液样品中存在非正常大含量的蛋白质 A 是患有癌症的诊断指标。蛋白质 A 是最容易用特异性抗体进行免疫反应来检测其存在的。优选的检测样品中蛋白质 A 存在的程序是使用两种分别对蛋白质 A 不同抗原决定区域具有特异性的抗体的三明治式 (Sandwich) 检测方法。

权利要求书

1. 一种检测个体的癌症的方法，该方法包括：
 - a) 从所述个体获取生物学样品；
 - b) 将所述样品与至少一种与蛋白质 A 发生免疫反应的抗体一起培养；
 - 5 c) 检测步骤 b) 所产生的免疫共轭物；以及
 - d) 将步骤 c) 检测到的免疫共轭物的数量对癌症进行评定，当所述的数量超过域限值就被定为患有癌症。
2. 一种检测个体的癌症的方法，该方法包括：
 - a) 从所述个体获取液体样品；
 - 10 b) 对所述液体样品进行三明治抗体检测，其中的两种抗体中的一种是与具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体，另一种抗体是与所述的具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的蛋白质 A 的部分发生免疫反应的抗体；
 - 15 c) 检测步骤 b) 所产生的抗体-蛋白质 A 三明治的数量；以及
 - d) 将该个体的所述数量对癌症进行评定，当所述的数量超过域限值就被定为患有癌症。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的抗体中的至少一种为单克隆抗体。
- 20 4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述的与所述的具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的蛋白质 A 的部分发生免疫反应的抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述方法，其中所述的与所述的具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体是连接有检测标记的多克隆抗体。
6. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述液体样品中的液体是血液。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中：
- a) 与所述的具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的蛋白质 A 的部分发生免疫反应的抗体是黏附到固体表面上的单克隆抗体；以及
- b) 与所述的具有蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体是连接有检测标记的多克隆抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述的连接的检测标记物是生物素。
9. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述的域限值是阴性对照平均值的 2.0 倍。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述的癌症选自乳腺癌、前列腺癌、原发性肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、肺癌、子宫内膜癌和多发性骨髓瘤。
11. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述的蛋白质 A 的大约 16 个氨基酸的特殊序列是蛋白质 A 的氨基酸序列的 142-158 或者是蛋白质 A 的羧基终端的 16 个氨基酸。

12. 一种检测癌症诊断性蛋白质的方法，其中所述的蛋白质在个体的血液中的增高水平预示该个体患有癌症，该方法包括：
- a) 培养所述个体的液体样品、与具有所述癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体、与所述的癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的癌症诊断蛋白质的部分发生免疫反应的抗体，从而形成所述癌症诊断蛋白质与所述两种蛋白质的免疫复合物；以及
- b) 测定步骤 a) 中所形成的免疫复合物的数量。
13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述的液体样品中的液体是血液。
14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述的液体样品与所述的两种抗体一起培养。
15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中：
- a) 所述的与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体连接有检测标记物的多克隆抗体；以及
- b) 与所述的具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的癌症诊断蛋白质的部分发生免疫反应的抗体是黏附到固体表面上的单克隆抗体。
16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述的连接的检测标记物是生物素。

17. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述的液体样品与所述的两种抗体同时培养。
18. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述的液体样品首先与所述的与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的癌症诊断蛋白质的其它部分发生免疫反应的抗体共同培养，然后与所述的与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体共同培养。
19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中
- a) 所述的与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的癌症诊断蛋白质的其它部分发生免疫反应的抗体是连接到固体表面的单克隆抗体；并且
 - b) 所述的与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的抗体是连接了检测标记物的多克隆抗体。
20. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述的癌症诊断蛋白质是生物素。
21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述的免疫复合物的数量是阴性对照的平均数值的 2.0 倍以上就预示该个体患有癌症。
22. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述的癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列是癌症诊断蛋白质的氨基酸序列的 142-158 或者是所述癌症诊断蛋白质的羧基终端的 16 个氨基酸。

23. 一种对个体检测转移性癌症的方法，该方法包括：
- a) 从所述个体获得生物学样品；
 - b) 将所述的生物学样品与至少一种与蛋白质 A 起免疫反应的抗体一起培养；
 - c) 检测所述步骤 b) 所产生的免疫共轭物；
- 其中在步骤 c) 中检测到非正常大量的免疫共轭物预示着该个体患有转移性癌症。
24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的生物学样品是血液。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述的癌症是乳腺癌。
26. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的抗体中的一种是 3B9E1，另一种是抗体 CY2a。
27. 一种结合蛋白质 A 形成免疫共轭物的抗体，其中所述的免疫共轭物的非正常大量预示着提供生物学样品的个体患有癌症。
28. 根据权利要求 27 所述的抗体，其中所述的生物学样品是血液。
29. 根据权利要求 28 所述的抗体，其中所述的抗体选自抗体 3B9E1、抗体 CY2a 和抗体 CPDD。
30. 一种检测个体癌症的测试盒，包括：
- a) 与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽发生免疫反应的第一抗体；以及
 - b) 与具有癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列的肽以外的部分发生免疫反应的第二抗体。

31. 根据权利要求 30 所述的测试盒，其中所述的第一抗体或第二抗体连接有鉴定标记物。
32. 根据权利要求 30 所述的测试盒，其中所述的第一抗体和第二抗体中的至少一种是单克隆抗体。
- 5 33. 根据权利要求 32 所述的测试盒，其中所述的第一抗体是连接有鉴定标记物的多克隆抗体并且所述的第二抗体是黏附到固体表面的单克隆抗体。
34. 根据权利要求 33 所述的测试盒，其中所述的连接的鉴定标记物是生物素。
- 10 35. 根据权利要求 30 所述的测试盒，其中所述的癌症诊断蛋白质是蛋白质 A。
36. 根据权利要求 35 所述的测试盒，其中所述的癌症诊断蛋白质的大约 16 个氨基酸的特殊序列是癌症诊断蛋白质的氨基酸序列的 142-158 或者是所述癌症诊断蛋白质的羧基终端的 16 个氨基酸。
- 15

进行检测。非正常地高浓度存在着这些免疫共轭物就指示提供样品的个体患有原发性或转移性癌症。

在本发明的优选实施方案中，癌症诊断性蛋白质是蛋白质 A，样品与蛋白质 A 的三明治式检测物一起培养。与蛋白质 A 起免疫反应的抗体被连接到固体支持物上。让样品与所连接的抗体以及
5 与该蛋白质 A 的另一个区域（即，与连接到固体支持物上的抗体发生免疫反应的区域以外的另一个区域）发生免疫反应的第二抗体进行反应。所得到的两个抗体-蛋白质 A 复合物就形成三明治（sandwich）检测物。对结合的第二抗体数量进行测定。该检测
10 到的第二抗体数量直接与连接的蛋白质 A 成比例。非正常大量的第二抗体的测定值指示在进行该检测的样品中存在原发性或转移性癌症。

本发明另一个优选方案是含有一种或多种用于进行癌症诊断性蛋白（例如，蛋白质 A）检测的抗体的试剂盒。抗体中的一种
15 是与癌症诊断性蛋白的一个抗原决定区域发生免疫反应的抗体，如果存在第二抗体，则该第二抗体是与该癌症诊断蛋白的抗原决定区域发生免疫反应的抗体，该抗原决定区域不同于与第一抗体发生免疫反应的抗原决定区域。在优选的试剂盒中，有与蛋白质 A 的两个抗原决定区域发生免疫反应的两种抗体。抗体之一
20 与固体支持物连接，例如与微滴盘小井的底部和壁连接。另一个抗体连接有可被识别的标记物。

本发明的另一个优选方案是与癌症诊断性蛋白质，既蛋白质 A 发生免疫反应的一种或多种抗体。这些抗体被用于对癌症诊断性蛋白的存在进行检测和探索。该检测可以使用样品，例如血
25 液样品来进行。

附图的简要说明

图 1 是以图形表示对可溶性蛋白质 A 的色谱分离：图 1A 是对经过高压液相色谱（HPLC）凝胶柱提纯的 A_s 形式的蛋白质 A 的光扫描结果；图 1B 是 HPLC 提纯后的 A_s 以 DEAE-纤维素阴离子交换柱再次色谱后的光扫描，并用线形盐梯度（虚线）确认提纯程序的有效性。

图 2 是用 SDS-PAGE 提纯的 A_m 和 A_s 的照相图。凝胶用银染色。第一条是提纯的 A_m ；第二条是提纯的 A_s ；第三条表示分子量的标准。

10 图 3 是在有腺嘌呤核苷酸存在下，以溶解性和膜结合形式的蛋白质 A 结合的 GTP-类似物 GMP-PNP 的图形。

图 4 是在有 $GTP\gamma S$ 存在下， A_s 和 A_m 的 ATP 酶活性的图示。

图 5 是表示对照个体和被诊断为患有转移性乳腺癌的个体的血液中蛋白质 A 的浓度。

15 本发明详述

本发明涉及对个体进行原发性和转移性癌症诊断的方法和组合物。原发性癌症指的是癌细胞的生长仅仅限于某一特定的身体解剖学区域内，或由形成起始癌症融合的细胞组成。转移性癌症指的是癌症的生长从其在体内起始的原发位点扩散到血液和/或淋巴系统，并且在离开原发肿瘤的其它位点生长；在对原发性肿瘤进行治疗后，还会再次扩散。

本发明的方法和组合物可以对众多的原发性和转移性癌症进行诊断。本发明的方法和组合物所能够诊断的癌症有，乳腺癌、

前列腺癌、肝癌、肺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、头颈
癌、子宫内膜癌、腮腺癌、胆道癌、肾和尿道癌、颈癌、甲状腺
癌、脑癌、口癌、子宫癌、腹癌、舌癌、唇癌、肛门癌、骨盆癌、
腹股沟癌、阴茎癌、胸癌、输卵管癌、POEMS、淋巴瘤、白血病、
5 多发性骨髓瘤、黑素瘤和肉瘤。这些癌症，很可能包括其它癌症，
都可以在其发展的各个期间，包括第一和第二阶段被诊断出来。
使用本发明的方法和组合物可以区分患有癌症、患有良性瘤和没
患有癌症的个体。

本发明的方法优选使用能够与癌症诊断性蛋白质发生免疫反
10 应的抗体。优选的癌症诊断性蛋白质是蛋白质 A。将一种或多种
抗体与个体的生物样品一起培养后，非正常大量存在着抗体-蛋
白质 A 免疫共轭物就表明该个体患有原发性或转移性癌症。

通常都使用血液作为优选的生物样品。当使用血液作为生物
学样品时，优选进行分析的血液成分是血浆或血清，更为优选的
15 是血清。由于血液和其它体液是优选的生物样品，所以，对免
疫反应性的癌症诊断性蛋白质，即蛋白质 A 的测定是在液体介质
中进行的。当血液为生物样品时，该液体介质在体内循环。这
样，本发明的方法就不必使用局部化的材料，例如进行活体检验，
相反，可以使用于那些易于得到的生物样品，例如，血清和血
20 浆。在使用血液样品的情况下，可被检测的癌症的种类也是相当
广泛的。

在本发明的具体实施例中，如果某一个体的生物样品中的蛋
白质 A 的浓度是非癌症患者的个体的对应样品中的蛋白质 A 的浓
度的二倍以上的话，就表明该个体患有癌症。换句话说，从没有
25 癌症的个体中获取相同量的生物样品，确定这些样品的蛋白质 A
的平均值，如果发现在某个体的相同量的生物样品中的蛋白质 A
的含量是没有癌症的个体的平均蛋白质 A 的含量的二倍以上，则

该个体就被认为患有癌症。在这些具体实施方案中，2.0（二倍）这个因子被认为是域限值。如果某些个体的生物学样品中的蛋白质 A 的浓度是不患有癌症的个体的蛋白质 A 平均浓度的二倍以上，则这些个体就被认为患有癌症，也就是说，受试者的样品中的蛋白质 A 的浓度与不患有癌症的个体的蛋白质 A 的浓度的比率大于 2.0。如果受试者的样品中的蛋白质 A 的浓度与不患有癌症的个体的蛋白质 A 的浓度的比率小于 2.0，则受试个体就不被认为患有癌症。该域限值 2.0 是优选的域限值。其它用于确定癌症的域限值也可以被建立。这些域限值的确定将取决于具体所用的癌症诊断检测的精确性和重复性，以及所需要的检测的预测准确性。

某个体的生物学样品中的蛋白质 A 的浓度数值可以为诊断性数值和预后性数值。在一定时期内连续确定某个体的蛋白质 A 的数值，可以监视癌症的发展（蛋白质 A 的数量增加），或癌症的消退，例如进行了治疗以后的效果（蛋白质 A 的数量降低）。所测定到的蛋白质 A 的数量可以是癌症存在和癌症迅速生长的指示。监测蛋白质 A 的数量，可以相对于某个体的基线进行，也可以相对于不患有癌症的个体的蛋白质 A 平均值进行。当蛋白质 A 的数量超过某一个用检测所监视的特定数值时，则该个体就被认为患有癌症。蛋白质 A 数量超过所建立的域限值的具体数值的大小，表示癌症的严重程度，如果这个数值变小，不论是否进行了治疗，都表明癌症严重程度的降低。

在本发明的另一个实施方案中，每毫升血液中的蛋白质 A 含量超过大约 10ng，则表明存在有转移性癌症。在这些方法中，对转移性癌症的检测也是建立在个体生物学样品（例如，体液样品中的血浆、血清、尿液等）中蛋白质 A 含量的测定基础上的。同样，生物学样品中蛋白质 A 含量指示着提供该生物学样品的个体

是否患有转移性癌症。非正常大量蛋白质 A 的存在表明有转移性癌症；正常的蛋白质 A 的数量标志该个体不患有转移性癌症。

这些检测的有用性是显而易见的，即以相对简单的检测来指示是否有原发性或转移性癌症的存在。

5 在确定生物学样品中蛋白质 A 含量的领域中，已经有众多的已知的技术。这些技术包括从样品中分离和定量蛋白质 A，诸如使用溶解和离心程序，柱色谱或凝胶电泳分离程序，过滤，酶识别，或者使用可以特异性识别和结合蛋白质 A 的分子的结合程序，例如，亲和性色谱或免疫检测。这些特异性结合的方法可以被用
10 来在原位测定生物学样品的蛋白质 A 含量，即测定该特异性结合分子在样品中的体积和分布区域。

 优选的测定生物学样品中蛋白质 A 含量的方法之一是用特异性结合蛋白质 A 或者蛋白质 A 的某一抗原决定基的抗体来进行的免疫生物学识别。这些抗体是本发明的组合物。这些抗体选择性
15 地识别蛋白质 A 决定物并且与其发生高亲和性结合。这些抗体可以单个使用于西方印迹（ Western Blot ）程序或示踪电泳图案分析，作为亲和性固定化基团或作为示踪结合基团，也可以同时使用多个抗体对不同的蛋白质 A 决定物或抗原决定基进行结合，正如在三明治（ sandwich ）检测中一样。本发明的抗体可以特异性
20 地结合蛋白质 A，所以蛋白质 A 或蛋白质 A 的特异性抗原决定基就可以被特定地检测到。

 可以使用于本发明的抗体是那些与蛋白质 A 发生反应的抗体。术语“抗体”包括单克隆和多克隆抗体。该术语“抗体”还包括一种以上的与蛋白质 A 反应的抗体的混合物（例如，多种与蛋白质 A 反应的单克隆抗体的组合体）。术语“抗体”还包括完整的
25 抗体，抗体的生物学功能性片段，具有与蛋白质 A 结合特性的单

链或单链的片段，以及包括从一种以上来源的部分组成的嵌合抗体，双功能性抗体等等。可以被使用的生物学功能抗体片段是足以使抗体片段结合蛋白质 A 的那些片段。

嵌合抗体可以包括来源于不同种起源的部分（例如，人恒定识别区和鼠可变区或结合区）。从不同起源来的部分可以被用常规的技术以化学方式连接起来，或者用遗传工程技术融合起来。此外，编码嵌合抗体蛋白质的轻链和重链的 DNA 可以同融合蛋白质一起进行表达。

已经确定的是特定的胞内分子，即蛋白质 A，是与肌醇有关的信号转导系统紧密相关的。在该系统中，蛋白质 A 的功能是活化磷脂酶 C (PL-C) 以生成第二信使肌醇-1,4,5-三磷酸 (IP_3) 和二酰基甘油醇 (DG)。在对膜结合受体进行刺激之后，蛋白质 A 与 GTP 结合以形成功能为激活 PL-C 的中间体。当该中间体的 GTP 被水解为 GDP 后，PL-C 的激活终止。因此，蛋白质 A 是重要的 G-型信号转导分子，对细胞肌醇代谢途径正常功能为关键性的。

这些信号转导分子对生产用于上述本发明方法的抗体是有用的。用于生产抗体的信号转导分子分离和纯化的蛋白质 A 和蛋白质 A 抗原决定基片段。

本发明的癌症诊断蛋白质，例如，蛋白质 A，还可以用于免疫治疗。当把这些蛋白质引入血液或淋巴系统后，它们可以刺激免疫系统的反应，即在宿主中识别所存在的癌并对其产生反应。因此，通过将外源的这些癌症诊断蛋白质引入到个体血液或淋巴系统，就可以刺激免疫系统产生免疫抑制活性来根除癌症。

此外，本发明的抗体可以具有治疗价值。当把它们给予个体后，它们可以同癌症诊断蛋白质，例如蛋白质 A 发生免疫反应，从而引发进一步的免疫系统反应，例如，通过刺激 T-细胞的生产，来消除个体的癌细胞。

5 术语“蛋白质 A”最早用于描述在通过还原条件下电泳移动力基础上确定的分子量为约 20 千道尔顿的柱状光受体蛋白质。通过对其作为已知蛋白质 A 基因的表达产物的蛋白质分析，得到该蛋白质 A 的分子量为 26 千道尔顿。通过对分离形式的蛋白质 A 进行改良的萃取和分离并结合初步的序列分析数据，表明该以前称
10 作蛋白质 A 的物体可能含有至少两种在结构上和功能上相关的蛋白质，一种是膜结合形式的，另一种是可溶性的。在此基础上，所用的术语反映出假设的活体内的状态：，膜结合的（20 kD），和 A_s，可溶性的（19 kD），同样，这是通过还原条件下电泳移动力基础上确定的分子量。这些蛋白质 A 包括下列的对于 N-端区
15 域的氨基酸序列：

GNSKSGALSKEILEELQ (SEQ ID NO :1) (A_m)； 和
MGNSKSGALSKEILEELQ (SEQ ID NO :2) (A_s)。

蛋白质 A 相关分子的进一步特征是它们包括一条具有显著水解区域的多肽单链。这些分子还具有结合及水解腺嘌呤核苷酸和
20 鸟苷三磷酸的能力，以及激活磷脂酶 C，磷脂酶 D 的能力，还可能具有在 GTP 存在的条件下激活磷脂酶 A₂ 的能力。

蛋白质 A 可以从哺乳动物（牛）和两栖类动物（蛙）的眼睛内光受体细胞的外杆节体（rod outer segments, ROS）通过提取，离心，色谱和其它本技术领域已知的蛋白质纯化技术分离出来。
25 从脊椎动物和无脊椎动物的不同的其它组织中也分离出来了具有相似或相等的结构或功能特征的蛋白质。这些发现表明，蛋白质 A

的结构在进化过程中被保留了下来。蛋白质 A 在水溶液中极不稳定，但是，将其放入含有非离子表面活性剂的水溶液中，则就可以使其被显著地稳定化。蛋白质 A 的分子量在 19-20 kD 之间，这是通过将其与在还原条件下的电泳分离的标准分子量进行比较而得到的。分离蛋白质的优选方法在以下给予描述。使用筛选分子量为 10 kD 和 30 kD 的过滤器得到了很好的纯化结果。

蛋白质 A，其各种被剪切的或其突变型蛋白类似物，以及包含蛋白质 A 和其它蛋白质区域的融合蛋白可以通过多种合成以及生物合成方法来生产。例如，适当的宿主细胞，例如微生物，酵母，真核细胞培养物等，都可以通过遗传工程来表达蛋白质 A 或其一部分或其类似物。这一点可以通过已经在本技术领域充分建立起来的 DNA 重组技术来实现。该重组程序可以包括对蛋白质 A、其一部分、其类似物进行编码的基因的分离及合成，以及将该基因整合到质粒中。蛋白质 A 的氨基酸序列也可以被确定。前述的氨基酸序列给出了两种形式的蛋白质 A（ A_m 和 A_s ）N-端氨基酸序列，即序列号 1 和序列号 2（SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2）。从寡核苷酸进行基因合成的技术以及已知的诱变技术提供了制备一系列类似物、剪切形式的蛋白质 A、包括蛋白质 A 或抗体结合区域的融合蛋白的技术。这些材料的生产还可以包括对适当的宿主细胞用载有包括对蛋白质 A、或其一部分、或其类似物进行编码的重组 DNA 的载体进行转化，培养被转化的宿主细胞，分离被表达的蛋白质。鉴于根据在此所述可以制备富含蛋白质 A 的样品，重组生产天然型式和其各种部分或类似物都是属于现有技术领域范围内的。

另外，通过将氨基酸按照正确顺序进行化学连接也可以制备至少该蛋白质的一部分。

分离的蛋白质 A、其一部分或其类似物，可以被用作抗原来生产在个体的液体样品中检测蛋白质 A 的抗体，从而进行对原发性和转移性癌症的检测。这些抗体可以是多克隆抗血清的一部分，或者是这些抗体的结合部分，对蛋白质 A 进行攻击，并且表现出对蛋白质 A、或其类似物、其片段，或对在 A_m 或 A_s 上的某一抗原决定起反应的。这些抗体可以用已知的方法多克隆或单克隆抗体。对抗体的选择最好使其不与其它的细胞成分发生反应。抗体可以是根据 Ouchterlony 双渗透试验 (Ouchterlony Double Diffusion Test) 确定的任何类别或亚类的抗体。优选 IgG 类别的抗体。此外，识别蛋白质 A 的抗体，可以全部或部分地被用生物合成或重组技术来合成。

另外，这些抗体可以同其它功能性分子结合，例如，毒素，荧光素或吸附性染料，酶，或放射性标记物。在优选的实施例中，抗体是与针对抗生物素蛋白或抗链霉生物素蛋白 (Streptavidin) 具有特别强的抗体亲抗原性的生物素分子连接的，而该生物素分子进而同荧光素、吸附性或放射性标记物连接。被连接的抗体可以用于从生物学样品中检测蛋白质 A，从而检测原发性和转移性癌症。抗体-标记物复合体可以通过化学连接或重组 DNA 技术来制备，如果标记物为蛋白质性质的物质。

抗体还可以用在给患者服用之后就可以立即进行对抗体的监视和成像的试剂来标记。该标记可以是放射性同位素，例如 ^{125}I 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ，这两种标记物都可以通过放射性检测方式例如伽玛射线闪烁照相来在体外成像。另外，抗体可以被 MRI 系统检测的非放射活性的、顺磁体造影剂来标记。在该系统中，强磁场被用来调整患者身体的原子的核旋转载体。然后，该磁场被干扰，随着核回到原来的平衡排列而对患者成像。在本发明中，抗体可以连接

到顺磁材料上，例如，钆、钴、镍、锰或铁的复合物，形成复合的诊断性造影剂，并可以在体外进行 MRI 成像。

5 如果抗体没有同功能性标记物连接，抗体-蛋白质 A 的复合体还可以使用标准的生物化学技术来检测，收复免疫沉淀物，例如通过离心来完成。

10 抗蛋白质 A 的单克隆抗体可以从由鼠骨髓瘤细胞与鼠脾细胞融合的杂交瘤细胞系中得到，该鼠脾细胞预先被用从例如牛 ROS 中提纯的蛋白质 A 免疫过。免疫源可以是根据已知的肽合成的机械程序或手工程序体外制备的蛋白质 A 的衍生物、其类似物或其一部分。另外，免疫源（蛋白质 A）可以通过本领域已知的使用重组 DNA 技术的生物合成方法来合成。选取其脾细胞进行细胞融合的小鼠优选遗传限定的谱系，例如 Balb/C。用于融合的骨髓瘤来自哺乳动物，抗体产生的细胞系，但是，最优选来自鼠细胞系，例如 NS-1。单克隆抗体来自用融合产物注射过的小鼠的腹水。

15 在本发明的优选实施例中，生产单克隆和多克隆抗体用的免疫源是从蛋白质 A 的已知氨基酸序列中选取的含有约 16 个氨基酸的肽。该免疫源是长度为约 10-18 个氨基酸的肽。在特别优选的实施例中，免疫源是 14 个氨基酸或 16 个氨基酸的羧基终端的蛋白质 A，含有蛋白质 A 的第 60-71 氨基酸的肽，含有蛋白质 A 的第 142-158 氨基酸的肽或含有蛋白质 A 的第 158-170 氨基酸的肽。当该免疫源被用来生产用于三明治检测中的抗体时，在大约为 16 个氨基酸的作为第一免疫源的肽之外，还要从蛋白质 A 中选用第二免疫源。获得与蛋白质 A 的第二免疫源发生免疫反应的抗体的另一种技术是用完整的蛋白质 A 对动物进行免疫，选择与不是第一个免疫源的蛋白质 A 的抗原决定基发生免疫反应而是与另一个蛋白质 A 的抗原决定基发生免疫反应的抗体。生产两套具有与不同抗原决定基发生免疫反应性质的抗体，保证了使用这种抗体的三

20

25

明治检测不会由于抗体对同一抗原位点的竞争而受到损害。这一特点提高了对样品中实际蛋白质 A 含量进行测定的灵敏性。

用已知的方法这样来生产的单克隆和多克隆抗体是对蛋白质 A 为特异性的，并且对蛋白质 A 的检测特别有用。

- 5 在本发明中，用所描述的方法可以对完整的蛋白质 A 和可检测的蛋白质 A 的片段进行检测。完整的蛋白质 A 或其可检测的片段的重要特性是这些蛋白质和肽的可被检测性，即它们与固定化的或检测用的抗体的免疫反应性。这些蛋白质和片段与抗体的复合物的形成和对这些复合物的检测都是必要的。这种可被检测的
10 复合物可以用蛋白质 A 的片段来形成。

- 本发明包括在生物样品如血浆或血清中检测蛋白质 A 数量的具体方法。在该方法中，与蛋白质 A 的第一抗原决定基结合的第一抗体黏附到固体支持物上。该黏附的第一抗体与受试生物样品接触。可以在与此同时或稍后将与蛋白质 A 的第二抗原决定
15 基结合的并被标记了的第二抗体加入到第一抗体与生物样品的混合物中，从而生成连接在固体支持物上的第一抗体：蛋白质 A：第二抗体的免疫复合物。该第二抗体连接在可被检测的标记物上。任何没有连接的第二抗体都被清除，然后，如果需要的话，对标记物进行检测，其存在和数量指示样品中的蛋白质 A 的存在和数
20 量。用这种检测所检测到的非正常大量的蛋白质 A，表明提供生物样品的个体很可能患有原发性或转移性癌症。换句话说，这个检测是对原发性和转移性癌症的诊断。

- 测试盒也是本发明的实施例。这些测试盒含有一种或多种多克隆或单克隆抗体，用于对生物样品如个体的血液中可能存在的
25 癌症诊断性蛋白质如蛋白质 A 进行检测。这些测试盒还可以含有固体支持物，例如进行检测用的微滴盘。对蛋白质 A 进行检测的

说明书也可以包括在该测试盒中。如果需要的话，可以对测试盒的抗体附加标签。在优选的测试盒中，提供的抗体可以在抗原为蛋白质 A 时，进行三明治式的检测。在本发明的特殊优选实施例中，三明治抗体中的一种是没有标签的，并且连接到固体支持物上。另一种抗体配有标签以用于检测。

以下的实施例进一步揭示了本发明，但不对本发明有任何限制。

本发明的最佳实施例

实施例 1

对可溶性 (A_s) 和膜结合的 (A_m) 蛋白质 A 的提纯

按照基本如 Schmidt et al. [*J. Biol. Chem.* 262:14333-14336 (1987)] 所述的方法，从牛眼睛的视网膜中分离蛋白质 A。牛眼睛（母牛或小牛）的眼睛在屠宰后的两小时之内得自于当地屠宰场。牛眼睛在暗室中至于冰上 30-60 分钟。切除视网膜并放如缓冲液 A 中（130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 每个小牛视网膜 1ml, 每个母牛视网膜 2 ml）。缓和地并重复地颠倒容器使大量的 ROS 进入缓冲液。该混合物通过 Buchler 漏斗以去掉视网膜。过滤物放在锥底试管中在冰上静置 5 分钟，让粗颗粒物质从 ROS 的悬浮液中沉淀出来。用血细胞计数器显微检验发现上清液中含有 95% 以上的 ROS。用注射器反复吸取并喷射到容器壁来产生剪切力使 ROS 被打碎。

为了分离颗粒物和液体部分，将该悬浮液以 10,000-12,000 x g 在 4 °C 离心 20 分钟。含有 ROS 膜的沉淀用与移出的上清液等体积的缓冲液 A 清洗一次。得到的沉淀重悬浮于 3-6 毫升缓冲液 T 中 [(0.05%) Tween 20/80 (1:1) 在重蒸蒸馏水中]，并且以 15,000 x g

离心 45 分钟。以上操作都是在暗红色光线下进行的。这两种蛋白质 A 的溶液（分别含有可溶性蛋白质 A 的上清液，以及含有膜结合的蛋白质 A 的上清液）用 Centricon 30 微浓缩器过滤（分子量的截取为 30 kD，Amicon Corporation），以 5,000 x g 在冷冻的离心机上离心。超滤物以 5,000 x g 在 Centricon 10's（分子量的截取为 10 kD）被浓缩和透析。

保留物中含有 10 kD — 30 kD 的蛋白质，当把体积缩至 0.5-1 毫升时，可溶性蛋白质 A (A_s) 的平均浓度为 100-200 微克/每毫升，膜结合的蛋白质 A (A_m) 的平均浓度为 30-100 微克/每毫升。对 A_s 的提纯使其含量提高了 320 倍，而对 A_m 的提纯使其增加了 20 倍。如果可溶性蛋白质 A 的溶液在浓缩和使用之前需要过夜的话，则将缓冲液 A 和 0.05% Tween 20/80 (1:1) 按照 1:5 的比例加入，以降低在浓缩液中的蛋白质凝集。

按照上述进行过超滤的蛋白质 A，在 Bio-Sil SEC-125 柱进行 HPLC 来进一步纯化，对 (A_s) 使用缓冲液 A，对 (A_m) 使用缓冲液 T，以进行序列分析。常液洗脱。合并的各峰被浓缩，对水进行透析，在进行序列分析之前冻干。

为了确定在实验中所用的蛋白质 A 的纯度，将按照上述用超滤纯化的 A_s 过 HPLC 尺寸的排阻柱（TSK-2000, Bio-Rad），缓冲液 A（图 1A），然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液在 DEAE 阴离子交换柱上进行再色谱。用 0-200 mM NaCl 梯度洗脱蛋白质（图 1B）。

对 A_m 和 A_s 的分子量的估计是依据它们各自在 SDS 凝胶（见实施例 2 和图 2）和校正的凝胶过滤柱上的相对移动来进行的。在柱上的天然形式的和在凝胶中的变性形式的分子量的结果的吻合说明蛋白质 A 在体内是以单体存在的。

以上所描述的对 A_s 纯化的结果是制备了高于 95%纯度的产物。在任何测试条件下, 纯化的 A_s 制剂中的蛋白质污染物都没有表现出与腺嘌呤核苷酸以及鸟嘌呤核苷酸发生相互作用。由于提取是顺序进行的, 则在所述的方法中, 对 A_m 的纯化得到基本均质的产物并且没有任何可检测到的污染物, 正如下述实施例 2 中 SDS 凝胶中以及图 2 中第一条所显示的那样。

纯化后, 蛋白质 A 在水溶液中的稳定性有了明显的改变。在纯化状态下, A_m 是亚稳态的, 并且在 4 °C 的数天中保留了其大多数的功能性。 A_m 还可以经受在洗涤剂中的冰冻和融化, 且所损失的原始活性不超过 15-20%。相反, A_s 在许多条件下都是不稳定的, 目前还没有发现任何方法可以在 4 °C 的 48 小时期间使其活性的损失不超过 80%。可溶性蛋白质 A 是明显的不耐热和不耐冷的。纯化的 A_s 在室温下迅速损失起活性 (半生命期=2 小时), 冷冻则损失几乎全部活性, 似乎其原因是蛋白的变性和/或凝集。纯化的可溶性蛋白质 A 在没有洗涤剂存在时, 很快凝集, 并在该条件下于冰箱内过夜时沉淀。

实施例 2.

对可溶性 (A_s) 和膜结合的 (A_m) 蛋白质 A 的凝胶电泳

根据对 O'Farrell [J. Biol. Chem., 250:4007 (1995)] 所描述的方法进行修饰后的方法来进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 有 0.1% SDS 存在于孔梯度凝胶中 (10%-20%)。样品放入样品缓冲液中, 0.33 mM DTT, 7% SDS, 17% 甘油, 0.5% M Tris-HCl, pH 6.8, 走平衡。样品不用进行热变性, 为的是不出现额外的由于形成稳定的聚合物的带。用 Bio-Rad 银染色试剂盒对蛋白质染色。用 Bio-Rad 的预先染色的标准分子量 (17-94 kD) 对凝胶进行校准。

如图 2 所示, 在还原条件下走凝胶时, “蛋白质 A” 的膜结合的 A_m 的分子量为约 20 kD, 可溶性 A_s 的分子量为约 19 kD。可溶性蛋白质解体为在凝胶上的两个非常靠近的带。而膜结合的形式移动为单一带。

5

实施例 3

鼠单克隆和多克隆抗蛋白质 A 的抗体的生产

Balb/c 小鼠 (6-8 周; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 用四次注射蛋白质 A 进行免疫。每次注射间隔 1 周, 每次注射量为 50 微克蛋白质 A (单独的 A_s 或 A_m , 或两者都用)。前三次注射采用腹膜内注射, 第四次采用静脉内注射。第一次注射时给蛋白质 A 配以完全 Freund's 辅剂, 第二次注射和第三次注射配以不完全辅剂, 最后一次不用辅剂。最后一次注射前抽取的血清用酶联免疫的固相微滴盘表明有与蛋白质 A 的明显结合。产生最好免疫反应的小鼠在最后一次注射的三天后被杀死。从该动物获得的淋巴细胞通过将它们作为抗体产生细胞亚克隆于 Cellco 生物反应器中以多克隆杂交瘤的形式保存下来。这些生产细胞处于液氮中低温保藏。从这些生产细胞获得的鼠多克隆抗体显示了对蛋白质 A 的特异性。

用杀死的小鼠的脾细胞与 NS-1 (P3NS-1/1-Ag4-1) 骨髓瘤细胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD; Accession No. TIB18) 进行融合。融合所用的方法是 Nadakavukaren [Differentiation, 27:209-212, (1984)] 的方法。对得到的克隆测定对蛋白质 A 的结合。对一个克隆连续稀释几次进行亚克隆。将具有最好生产功能的亚克隆注射到 Balb/c 小鼠的腹腔中, 一产生含有多克隆抗体的腹水。对所得到的腹水进行离心, 测定活性, 然后在 -70 °C 包藏直至使用。

25

对得到的 18 个抗蛋白质 A 抗体进行抗体同模筛选，使用 Ouchterlony 双链渗透试验，在琼脂板上对抗-IgM，抗-IgG，抗-IgG1，抗-IgG2a，抗-IgG2b，抗-IgG3 等抗体（Cappell）筛选。结果列于表 1。

5

表 1

<u>mAb 名称</u>	<u>同 模</u>	<u>mAb 名称</u>	<u>同 模</u>
3A9A5	IgG 2a	3A9F2	IgG 2a
3A12D7	IgM	3A12E9	IgM
4C5B4	IgM	4C5F3	IgM
5E6B1	n.d.	5E6H5	n.d.
7E4F9	n.d.	7E4H12	n.d.
9D8F8	IgG 2a	9D8G11	IgG 2a
1B9B2	IgG 1	3A7G6	n.d.
3B6C12	IgG 2a	3B9E1	IgM, IgG (混合表达)
3F5H11	n.d.	4C8B2	n.d.

“n.d.”---未确定

实施例 4

检测蛋白质 A 与 DTP 和 ATP 的结合及对它们的水解；
蛋白质数量；和蛋白质 A 的存在

A. GTP 酶和 ATP 酶检测

10 可溶性和膜结合性蛋白质 A 对 GTP 和 ATP 的水解率在 200 微升的总体积中进行。1.0-10.0 微克 A_s 或 A_m ， 5×10^{-5} M GTP 或 ATP，67-335 nM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (2.8 Ci/mmol) 或 88.8-177.5 nM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2.8 Ci/mmol) 和 20 微升剥下的 ROS 膜（当为 A_m 时）混合于缓冲液 J（20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA）。制备被剥下的
15 的 ROS 膜采用的是对 ROS 膜用缓冲液 C（100 mM NaCl, 20 mM

Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM MgCl₂) 洗三次, 并用含有 0.01% 聚氧
乙烯 23 月桂醚 (Brij 35 非离子洗涤剂, Sigma Chemical Co.) 的
水洗三次。在使用之前, 被剥下的膜重悬浮于缓冲液 D (10 Mm
Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EGTA) 。

- 5 调查光对 GTP 或 ATP 的水解作用, 使用的方法是双份光暴露
培养实验[10 毫秒氙灯 (Nikon) 提供 $1.8 \times 10^3 \mu\text{Wcm}^2/\text{秒}$, 其足
以使样品中的 70% 的视紫红变白], 在暗室中的为对照。样品在室
温下培养 5 分钟, 用 200 微升冰冷的淬灭缓冲液 (50 nM KH₂PO₄,
6% 苏长岩 A, 10% TCA) 淬灭。样品置于冰上 30 分钟, 并在微
10 离心机上离心 5 分钟。每种上清液取等份试样 50 微升, 放入有 5
毫升闪烁液的小瓶中, 检测放射活性。在有和没有光裂解视紫红
存在的条件下, 对 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 水解进行测定。

- A_m 的 GTP 酶活性在有激活的受体存在下被增强。相反, 对处
于暗室中的培养物加入未光裂解的视紫红, 并没有产生可以观测
15 到的对水解率的作用。在没有视紫红存在时, 或存在有为白化的
视紫红时, A_m 只有可以忽略的 GTP 酶活性。

- 按照摩尔/摩尔计, A_m 对 GTP 的水解率 (0.458 GTP/秒/ A_m)
是可以同转导 (0.512 GTP/秒/ $T\alpha$) 相比较的, 两者都是在有光激
活的视紫红存在的条件下在亚最高速度进行测定的。对 A_m 的和转
20 导的 GTP 酶活性在两种纯化的蛋白质以大约等摩尔浓度存在时,
是催化性的。

在所有进行的受试条件下, 纯化的 A_s 对 GTP 的水解率 (GTP
酶活性) 相对于白化的和未白化的视紫红为不敏感的。

对 A_m 和 A_s 的 Michaelis 常数是对 1 千倍底物浓度测定 GTP 水解率而得到的。通过建立双向交互标绘图和回归分析得到 K_m 和 V_{max} 。数据表达为平均值 \pm S.D.结果列于表 2。

表 2

数值	GTP 酶	(n)	ATP 酶	(n)
$K_m : A_s$	$2.06 \pm 2.46 \times 10^{-6} M$	(4)	$1.50 \pm 1.47 \times 10^{-4} M$	(3)
$K_m : A_m$	$2.39 \pm 1.87 \times 10^{-6} M$	(3)	$1.44 \pm 0.56 \times 10^{-5} M$	(3)
$V_{max} : A_s$	N.D.		0.56(\pm 0.09) pmol/mg 蛋白质 A/分	
$V_{max} : A_m$	16.4nmol/mgA _m /分		2.90(\pm 0.16) pmol/mg 蛋白质 A/分	

5 在有视紫红存在下，对 A_m 和 A_s 的 K_m 值是相似的，指示对 GTP 的相似亲和性。

未与受体结合的 A_m 和 A_s 被发现具有 ATP 酶活性。对 A_m 和 A_s 以及 ATP 酶的 K_m 值均列于上面的表 2 中。比较 A_m 的比率的常数指示其对 ATP 的亲和性是比较 A_s 的高一个数量级。对 A_m 和 A_s 的 ATP 酶和 GTP 酶活性的相对 K_m 值指示 GTP 是水解和结合的优选底物。

在培养物中加入视紫红没有提高任何一种蛋白质的 ATP 水解率。在有激活的受体存在下，ATP 酶的比率仅仅稍有降低。

B. GTP 结合检测

根据 Northup et al. [J. Biol. Chem., 257:11416-11423 (1982)]的方法, 对 A_m 和 A_s 与 GTP-类似物 Gpp(NH)p 以及 GTP γ S (New England Nuclear)的结合进行测定。在含有 5-10 微克纯化蛋白质
 5 A_s , 15.3 μ M 3 H-Gpp(NH)p (10 μ Ci) 或 1.32 μ M GTP γ S³⁵ (1 μ Ci)和缓冲液(100mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0)的总体积为 100 μ l 的溶液中进行结合。该样品经涡旋后在 25 $^{\circ}$ C 培养 30 分钟, 用 200 微升冰冷缓冲液 (0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 0.1% Tween 80) 淬灭, 放置在冰上 30 分钟。用 2 毫升同样的缓冲液洗
 10 硝基纤维素过滤器, 让样品通过该过滤器。该过滤器用 2 毫升冰冷的缓冲液洗 5 次, 对放射性活性进行检测。

在室温下的短暂培养中, A_m 与 GTP γ S 和 Gpp(NH)p 同时结合。结果见于表 3。

表 3

蛋白质 A 的形式	Gpp(NH)p mol GTP	GTP γ S 类似物/ mol 蛋白质
A_m	0.57 \pm 0.12	0.93
A_s	0.29 \pm 0.08	0.47

15 很明显, 这个方法不要求辅助因子。在所使用的试验条件下, A_m 对每种 GTP 类似物的结合少于化学数量。在有辅助因子存在的条件下进行相似的培养, 以摩尔/摩尔计, A_s 以结合这些类似物的数量明显地少。 A_m 和 A_s 对 GTP γ S 的结合比对 Gpp(NH)p 结合更容易。

C. ATP/GTP 竞争

腺嘌呤核苷酸对 Gpp(NH)p 与 A_m 和 A_s 混合物的结合的影响被确定, 根据的是蛋白质 A 对 ATP 的结合与水解的能力。纯化的 A_m 和 A_s 被混合 (2:1), 用 ATP 或 ADP 预培养, 在通过快速过滤
5 进行短暂培养之后, 测定 Gpp(NH)p 的结合。如图 3 所示, ATP 在所有试验的浓度都是结合的有效抑制物。ADP 在高浓度时为浓度依赖性的结合抑制物。

与腺嘌呤核苷酸对 Gpp(NH)p 结合的作用相反, 其对蛋白质 A 对 GTP 的水解只有可忽视的影响。然而, 在微摩尔浓度时, 发现
10 GTP γ S 在 1 小时的培养期对 ATP 的水解有显著的抑制 (图 4)。GTP 有类似的对 ATP 的水解的影响, 但是小的多, 指示这两种核苷酸竞争同一或近似的蛋白质 A 的结合位点。这些结果还支持 GTP 对蛋白质 A 的结合是比 ATP 更为有效的竞争物。

D. 蛋白质检测

15 根据 Bradford [Anal. Biochem., 72:248 (1976)] 的方法, 使用 Bio-Rad 微检测 (Coomassie Brilliant Blue G-250), 对蛋白质的浓度进行确定。使用牛血清白蛋白作为标准。

以纯化物进行的蛋白质检测为基础, A_m 相对 A_s 的补充为 (A_m/A_s) 0.47。用高压柱色谱 (如同 280 nm 的光密度的估计值)
20 和 slab 凝胶 (如同密度计的估计值) 回收到的被分离的可溶物的数量比是几乎统一的。这表明, 如果两种可溶性形式的是分离的基因的产物, 则各种形式的蛋白质 A 被从杆状细胞中以相当的数量提取出来。如果不是, 则膜结合的形式就应该是可溶性的一半浓度。

E. 对蛋白质 A 的检测

针对蛋白质 A 产生的本发明的抗体被用来创造探索人血清中该抗原的检测。该方法利用酶联免疫吸附检测 (ELISA)。这一检测的一个具体形式在下面的实施例 8 中给出。

5 用于本发明的 ELISA 是“三明治”形式的。这个检测需要两种不同的对蛋白质 A 为特异性的抗体，每一种抗体识别该蛋白上的不同的抗原决定基并与其结合。其中一种抗体起着“捕获”剂的作用并且是没有被修饰过的，用于对标准 96 孔微滴盘小孔的底部包被。没有被使用的那一部分的这种抗体从小孔中移出，将封
10 闭剂[1%牛血清白蛋白 (BSA)]加入到小孔中来封闭非特异性的结合位点。先证者的血清在准备好了的小孔中培养 1-12 小时，然后移出。用洗涤剂溶液清洗小孔，将第二抗体与溶液中加入到小孔中。在该方法中使用的第二抗体物理地连接有标记物质如酶，例如，辣根过氧化物酶 (HRP)。在这个培养之后，移出第二抗体，
15 再清洗小孔一次。最后的步骤包括加入适当的比色物质。

预先进行 ELISA，使用各种捕获和共轭酶与纯化的抗原 (蛋白质 A) 的组合来确定可能的识别位点的重叠，从而预测确定这些抗体对 A 的不同抗原决定基的特异性。

颜色发生的数量与酶联的小孔中结合的抗体成正比，与小孔中的“捕获”抗体结合的抗原的数量成正比。得到的结果被用分光光度计定量化，确定在预定的期间内 (一般为 30-120 分钟) 所产生的颜色量。上述的 ELISA 被用来试验正常志愿者的人血清，癌症患者的人血清，以确定蛋白质 A 抗原的存在。在该检测中的阳性域限值用正常群体来确定。该检测的灵敏度至少可以达到一位
20 数的 ng/ml 级，这是由使用已知数量的纯化的抗原建立标准灵敏度
25 曲线而确定的。

在患者群中进行的初步测试得到了以下的定性结果。对试验的结果与正常人的结果进行比较，从被诊断为肺癌、淋巴瘤、胃癌、直肠癌、肠癌、乳腺癌的患者中，得到了阳性的结果。

实施例 5

5 制备与蛋白质 A 的羧基终端区起免疫反应的兔多克隆抗体

使用下述的程序制备与蛋白质 A 的羧基终端区起免疫反应的兔多克隆抗体。

在一种制备程序中，合成了已经公开了的人蛋白质 A 的羧基终端 14 个氨基酸的序列，QFEPQKVKEKMKNA (SEQ ID NO:3)。将该合成的肽与 Freund's 辅剂的混合物对每个兔子在 3-4 个位点进行皮下注射。每次注射的合成肽的量为 50 微克。两周后，对每个已经接种过的动物再次于 3-4 个位点注射肽与 Freund's 辅剂的混合物。再过两周后，取血样，测定抗体在血液中对合成肽的效价。如果需要，就进行再次注射以维持适当的血液抗体效价。收集具有适当血液抗体效价的兔子的血清，以亲和色谱并使用固定在固体基质上的合成的羧基终端肽得到纯化的所需抗体。将所得到的纯化的抗体对水透析沉淀，以干粉的形式保藏待用。这些兔子多克隆抗体与蛋白质 A 的羧基终端区域衍生出来的肽反应，并被定名为 CY2A 抗体。

在另外一个程序中，合成制造了蛋白质 A 羧基终端的约 16 个氨基酸的肽序列。然后，将这个肽与有力的免疫刺激物（辅剂）分子：关键点缺陷血清蛋白 [Keyhole Limpet Hemacyanin (KLN)] 共轭。肽-KLN 共轭体按照产生抗体的正常程序注射给兔子。随后，取出兔子的血，测试血清，结果显示对作为免疫源的蛋白质 A 羧基终端肽为阳性。这些兔子多克隆抗体被定名为 CPDD 抗体。

实施例 6

测定液体样品中的蛋白质 A

为了测定样品中的蛋白质 A，使用下述程序之一：

A. 对含有实施例 3 的一种单克隆抗体（3B9E1 抗体）的溶液
5 取等份试样，放入 96 孔滴定盘的每一个小井中，放置至干燥，留下的抗体附着在每一个小井的底部。向每一个小井中加入 1% 牛血清白蛋白溶液的等份试样进行封闭。取出残余的液体。每一种受试样各取 50-100 微升，放入指定的小井，在室温下培养 1 小时。弃去液体，用磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）清洗小井。对连有辣
10 根过氧化物酶的实施例 5 的抗体（CY2A 抗体）的标准溶液取等份试样，加入到每个小井中，室温下培养 1 小时。移去液体，用 PBS 清洗每个小井。最后，加入辣根过氧化物酶底物和 2,2'-连氮基-二-[3-乙基-苯基噻唑啉磺酸酯（6）]二铵盐（ABTS）的等份
15 试样，于 37 °C 反应 1 小时。用 410 nm 处的分光光度计定量每个小井中的颜色。对照标准曲线将这些颜色结果转换为单位。

B. 在另一个程序中，使用了生物素/链霉抗生物素蛋白的测定系统。实施例 5 的 CPDD 抗体首先用化学方式与生物素共价共轭。将激活的生物素的 N-羟基-琥珀酰亚胺酯与纯化的抗体反应，使生物素分子与抗体分子的伯胺共价结合。以色谱去除未反应的生物
20 素。然后对抗体用免疫抗原滴定，确定最佳的检测稀释。

总的来讲，这些程序按照如下进行：

生物素化的抗体首先与其目标抗原结合。同时，固定在固体支持物（滴定盘）上的第二抗体也捕获到同样的抗原。清洗除掉未反应的抗体，抗体：抗原：生物素化的抗体的复合物与共轭有报
25 道分子的链霉抗生物素蛋白发生反应，报道分子一般是酶，例如

辣根过氧化物酶。再次进行清洗，去除未结合的链霉抗生物素蛋白：酶。对酶标记的链霉抗生物素蛋白为特异性的底物被允许同余下的链霉抗生物素蛋白：酶复合物反应。底物被水解为产色的产物的数量与样品中抗原的数量成正比。

- 5 生物素/链霉抗生物素检测系统的优点是抗体可以被多个生物素分子标记，但不损失抗体活性。每一个抗体分子上有一个以上生物素分子这一事实，使得信号在通过随后的多个链霉抗生物素分子的结合而被放大了。

具体讲，使用生物素化的抗体的程序按照如下进行：

- 10 含有实施例 3 的一种单克隆抗体（3B9E1 抗体）的标准溶液的等份试样放入滴定盘的每一个小井中。让抗体吸附到每个小井的底面和侧壁。吸出每一个小井中的剩余溶液，含有 20%蔗糖的 1%牛血清白蛋白溶液的等份试样被加入到每一个小井中进行封闭。移出残余液体。

- 15 随后的试剂被升温至室温。患者的样品（EDTA 血浆）被混合，如果发现有任何颗粒物质，通过离心使液体清晰。将 50 微升患者血浆的等份试样与在 0.05M 磷酸盐缓冲生理盐水 pH 7.4 中的带有 1 mg/mL 牛血清白蛋白的生物素化的 CPDD 兔多克隆抗体 200 微升相混合，加入到每一个小井中。让这些液体在小井中反应 2
20 小时。然后吸出液体，清洗小井 3 次，每次吸出液体。

- 到达程序的这一点时，向每个小井中加入链霉抗生物素蛋白：辣根过氧化物酶共轭体 200 微升，在室温下反应 1 小时。如上对小井清洗 3 次。这一步骤之后，将 200 微升的四甲基-联苯胺底物用移液管加入到每个小井中，室温下培养 20 分钟。然后，加入 100
25 微升停止溶液（0.05N 硫酸）。用双波长滴定盘分光光度计在

450/630nm 处读取每个小井的光吸收。计算每个样品的平均吸收值。（如果进行的重复样品试验的读数的差异超过 10%，重新对该样品进行试验）。样品的读数超出测量范围的，经过稀释后重新检测。用对照的平均值除以每个样品的平均值，得到 P/N 值。

- 5 P/N 值大于 2.0 的样品被报道为阳性。

为了建立阴性对照值（N）的基线，对 40 个阴性样品以双份进行检测，确定最适宜的建立在阴性和阳性之间的划界。去掉两个最高和两个最低的样品数值，计算几何平均值，对剩余的样品重新计算平均值和标准偏差。对阳性的划界点被人为地定在剩余样品的平均值加 2 个标准偏差的地方。巧合的是，平均值加 2 个标准偏差的结果非常接近平均值的 2 倍。因此，对有些检测的阳性划界就定为用所谓 P/N 比值为 2.0，即未知样品的数值被阴性对照样品的平均值所除的结果。

此后，建立阴性人血清群，作为检测对照/标准。这些材料的平均吸收值基本与上述阴性样品的几何平均值相等。因此，将该阴性对照根据阴性血清进行校正，作为检测对照。对每一个检测都进行双份的所述对照群检测，以阳性划界计算的平均吸收值为阴性对照的平均值的 2 倍。

实施例 7

20 探索转移性癌症的筛选程序

收集多个个体的血样品。在该个体组中，有被诊断为转移性乳腺癌患者，从对照群中选取的没有癌症的个体，以及曾经被诊断为患有癌症但是在采取血样的时候被诊断为所患有的乳腺癌正在消退的个体。

每一个体的样品的一部分被用来作为实施例 6A 的检测样品。
对这些个体的血液样品的检测结果见于表 4。

表 4

样 品	诊 断	检测结果
		(ng 蛋白质 A/ml 血)
gjs	对照	2.4
afb	对照	7.6
sac	对照	2.4
CY 02	NED(前列腺)	1.8
CY 02	对照	1.6
2	对照	3.5
3	对照	9.7
6	对照	8.8
7	对照	2.8
8	对照	7.1
4	NED	4.7
1	NED	3.5
9	NED	3.8
5	NED	3.3
18	Mets; no chemo	15.7
49	Mets; no chemo	3.7
132	Mets; no chemo	12.7
423	Mets; no chemo	24.3
424	Mets; no chemo	26.4
515	Mets; no chemo	59.0
541	Mets; no chemo	22.3

在诊断中，NED 指的是没有发病的证据。这些检测的结果还
5 反映在图 1 中。作为对照的和被诊断为癌症正在消退的个体结果
之和的平均值是 4.5 ng 蛋白质 A/ml 血液。患有转移性癌症的个体

的检测结果平均值为 23.4 ng 蛋白质 A/ml 血液。只有一个例外，即有一个被诊断为转移性癌症患者的检测结果在对照和 NED 范围内，所有的检测结果都可以被清楚地划分为两组：没有癌症迹象的个体组和患有转移性癌症的个体组。这样的分界是不常见的。这些结果的统计学显著性为 $p < 0.001$ ，t 实验。

实施例 8

对原发性和转移性癌症测定的筛选

在扩展的筛选程序中，选用了 800 名患者的血浆样品进行实施例 6B 的检测。患者群中包括没有癌症的个体（对照），各种阶段癌症患者，转移性癌症患者，良性瘤患者。筛选程序是采用盲点方式进行的，对蛋白质 A 的检测结果随后对照独立的临床诊断结论以确认检测。

这个筛选的结果列于表 5。给出了癌症的种类，阶段，以及患有癌症的个体的数目，该数目用对照独立临床诊断结果来校正。

表 5

癌症类型	检测阳性/总样品数	
乳腺癌	24/35 = 69%	
	第 1 阶段	1/6
	第 2 阶段	3/4
	第 4 阶段	1/2
	?	19/23
原发性肝癌	17/25 = 68%	
	第 2 阶段	1/1
	第 3 阶段	5/7
	第 3b 阶段	1/1
	第 4 阶段	2/4
	第 4a 阶段	7/9
	第 4b 阶段	1/3

癌症类型		检测阳性/总样品数	
胰腺癌	6/9 = 67%	第 4 阶段	6/8
		第 4a 阶段	0/1
		第 D2 阶段	0/2
前列腺	24/41 = 61%	?	25/39
膀胱癌	11/19 = 58%		
淋巴瘤	18/32 = 56%	第? 阶段	2/3
		第 1 阶段	0/1
		第 1a 阶段	1/1
		第 1b 阶段	0/1
		第 2a 阶段	1/4
		第 2B 阶段	0/1
		第 2bc 阶段	1/1
		第 2c 阶段	1/1
		第 2ca 阶段	1/1
		第 3b 阶段	3/4
		第 4 阶段	3/6
		第 4a 阶段	0/1
		第 4B 阶段	4/4
		第 4b 阶段	1/3
头颈癌	9/16 = 56%	第 3 阶段	1/2
		第 4 阶段	4/10
		第? 阶段	4/4
肺癌	41/91 = 45%	第 1 阶段	4/5
		第 2 阶段	2/4
		第 3a 阶段	2/5
		第 3b 阶段	6/13
		第 4 阶段	10/27
		第 ED 阶段	4/6
		第 LD 阶段	2/7
		第?阶段	11/24

癌症类型	检测阳性/总样品数	
结肠和直肠癌	17/43 = 40%	
	第 2 阶段	0/1
	第 4 阶段	1/3
	第 B1 阶段	2/2
	第 B2 阶段	1/4
	第 C2 阶段	2/4
	第 D 阶段	3/3
	第 ? 阶段	8/26
白血病	10/26 = 38%	
多发性骨髓瘤	5/5 = 100%	
	第 3a 阶段	3/3
	第 3b 阶段	2/2
子宫内膜癌	5/5 = 100%	
	第 4 阶段	1/1
	第 ? 阶段	4/4
腮腺癌	4/4 = 100%	
胆道癌	3/10 = 30%	
	第 3 阶段	1/1
	第 4 阶段	2/8
	第 4a 阶段	0/1
肾癌	2/6 = 33%	
	第 3 阶段	1/2
	第 4 阶段	1/2
	第 ? 阶段	0/2
子宫颈癌	3/4 = 75%	
	第 4 阶段	1/1
	第 4a 阶段	1/1
	第 ? 阶段	1/2

癌症类型		检测阳性/总样品数	
甲状腺癌	2/3 = 67%	第 1 阶段	1/1
		第 4 阶段	1/2
脑瘤	4/6 = 67%		
口腔癌	2/3 = 67%		
子宫癌	2/7 = 29%		
转移性癌症 (未知起源)	2/7 = 29%		
黑素瘤	2/2 = 100%	第 4 阶段	2/2
卵巢癌	0/2 = 0%		
腹癌	1/2 = 50%		
尿道癌	0/2 = 0%		
舌癌	1/3 = 33%		
唇癌	1/1 = 100%		
肛门癌	1/1 = 100%		
骨盆癌	1/1 = 100%		
腹股沟癌	1/1 = 100%		
阴茎癌	1/1 = 100%		
胸腔癌	1/1 = 100%		
输卵管癌	1/1 = 100%		

癌症类型	检测阳性/总样品数
肉瘤	2/7 = 29%
POEMS	1/1 = 100%
喉癌	0/2 = 0%
生殖细胞癌	0/1 = 0%
脊椎癌	0/1 = 0%
睾丸癌	0/1 = 0%
阴门癌	0/1 = 0%
脾癌	0/1 = 0%
癌症总计	262/518 = 51%

此外，本检测还在正常个体（没有癌症）和有良性瘤的个体中进行。结果列于表 6，其中“矫正”检测值是（正确地确定该个体没有癌症）当该个体的 P/N 值等于或小于 2.0。

5

表 6

	检测结果 低抗原数量/样品总数
正常	174/205 = 85%
良性瘤	70/108 = 65%

这些检测的结果表示该检测程序具有辨别癌症患者和不是癌症患者的能力。用该检测可以探察原发性和转移性癌症。各个阶段的癌症，包括第一阶段和第二阶段的癌症都可以被检测。特别

是乳腺癌、前列腺癌、原发性肝癌、淋巴癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌、多发骨髓瘤癌都可以用本检测来探索。

等价方案

- 5 精通工艺的人都会承认或者利用不多于例行试验次数的试验就能确定在此具体介绍的本发明实施方案有许多等价方案。这些等价方案已被纳入权利要求范围。

序列数据

(1) 概况

(i) 申请人

(A) 名称: Schepens Eye Research Institute
(B) 街道: 20 Staniford Street
(C) 城市: 波士顿
(D) 州/省: 马萨诸塞州
(E) 国家: 美国
(F) 邮政编码: 02114
(G) 电话: 617-742-3410
(H) 传真: 617-720-1069

(i) 申请人

(A) 名称: CYTRA CORPORATION
(B) 街道: 82 Beachside Avenue
(C) 城市: Greens Farms
(D) 州/省: 康涅狄格州
(E) 国家: 美国
(F) 邮政编码: 06436
(G) 电话: 203-259-6876
(H) 传真: 203-255-2386

(i) 申请人/发明人

(A) 名称: Geoffrey J. Schmidt
(B) 街道: 73 Tiffany Road
(C) 城市: Norwell
(D) 州/省: 马萨诸塞州
(E) 国家: 美国
(F) 邮政编码: 02061

(i) 申请人/发明人

(A) 名称: Kenneth L. Hoffman
(B) 街道: 95 Comstock Drive
(C) 城市: Wrentham
(D) 州/省: 马萨诸塞州
(E) 国家: 美国
(F) 邮政编码: 02093

(ii) 发明名称: 以蛋白质 A 对癌症的诊断

(iii) 序列数目: 3

(iv) 通讯地址:

5 (A) 地址: Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C.

(B) 街道: Two Militia Drive

(C) 城市: 列克星顿市

(D) 州: 马萨诸塞州

(E) 国家: 美国

10 (F) 邮编: 02173

(v) 计算机可读形式:

(A) 存储形式: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

15 (D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version # 1.25

(vi) 申请信息:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类号:

20 (vii) 在先申请的信息:

(A) 申请号: US 08/370,969

(B) 申请日: 1995 年 1 月 10 日

(viii) 律师/代理人:

(A) 姓名: Wagner, Richard W.

25 (B) 代理号: 34,480

(C) 案卷号: SERI88-01A3 PCT

(ix) 通讯:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列的特征:

(A) 长度: 17 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列的表述: SEQ ID NO:1

Gly Asn Ser Lys Ser Gly Ala Leu Ser Lys Glu Ile Leu Glu Glu Leu Gln

1 5 10 15

(3) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列的特征:

10 (A) 长度: 18 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑学: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列的表述: SEQ ID NO:2

Met Gly Asn Ser Lys Ser Gly Ala Leu Ser Lys Glu Ile Leu Glu Glu Leu.Gln

1 5 10 15

15 (4) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列的特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑学: 线形

20 (ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列的表述: SEQ ID NO:3

Gln Phe Glu Pro Gln Lys Val Lys Glu Lys Met Lys Asn Ala

1 5 10

说明书附图

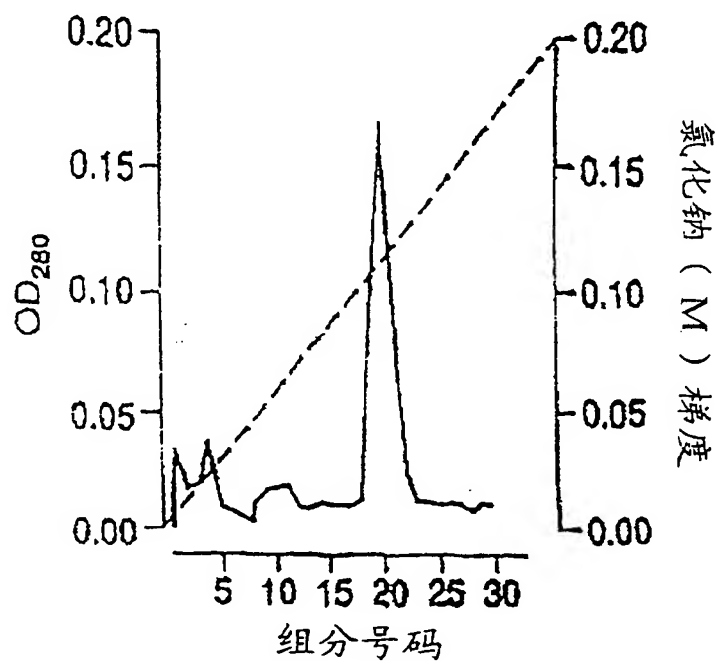


图 1A

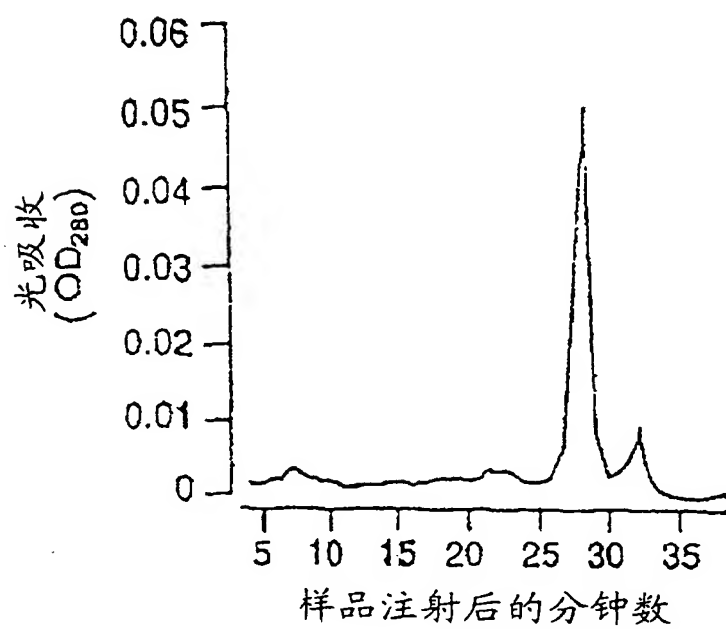


图 1B

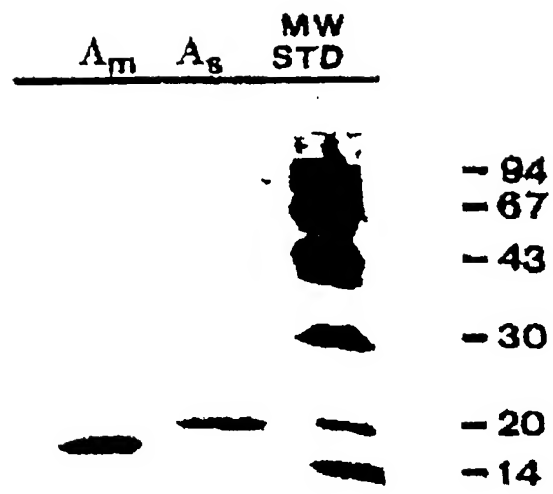


图 2

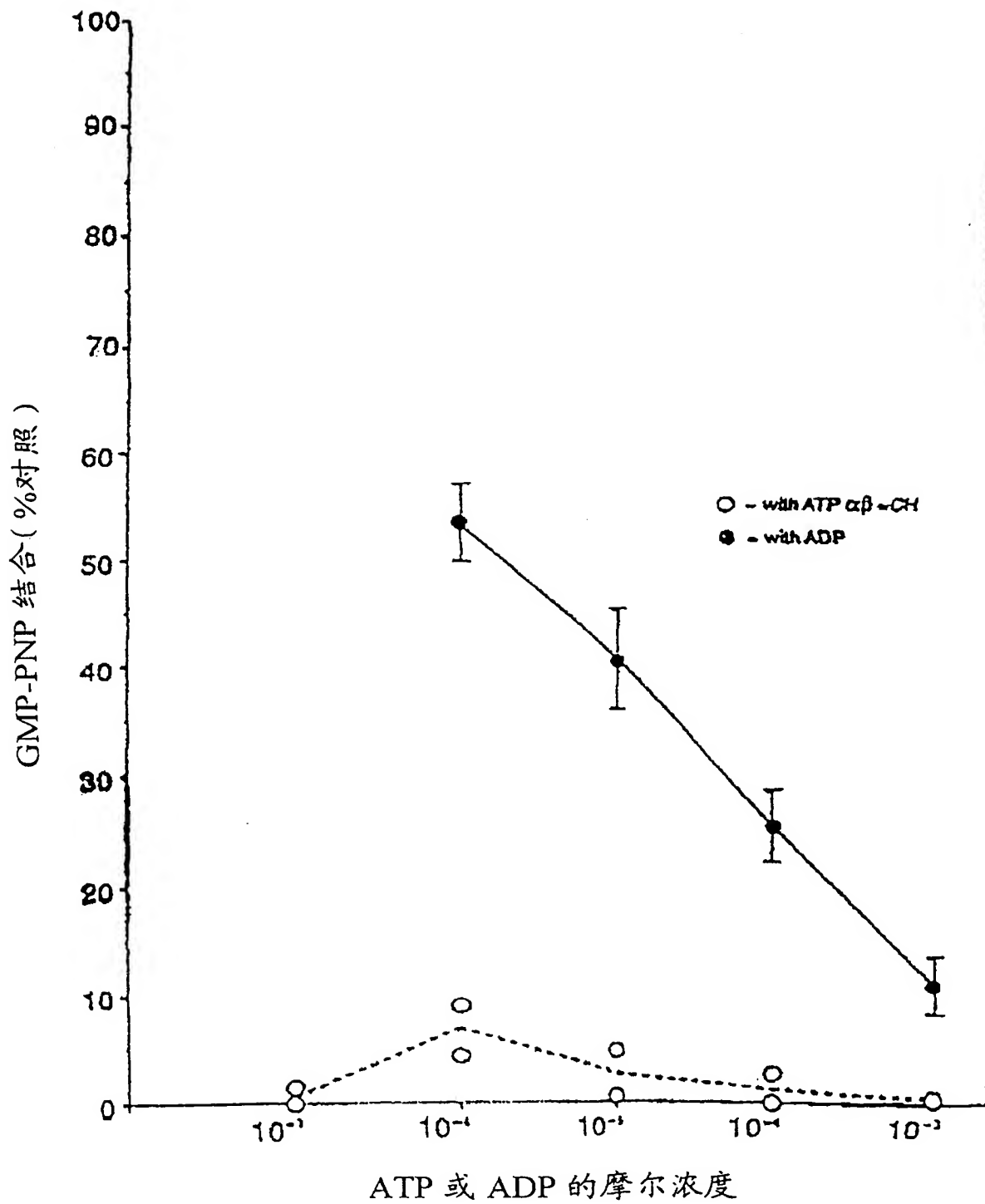


图 3

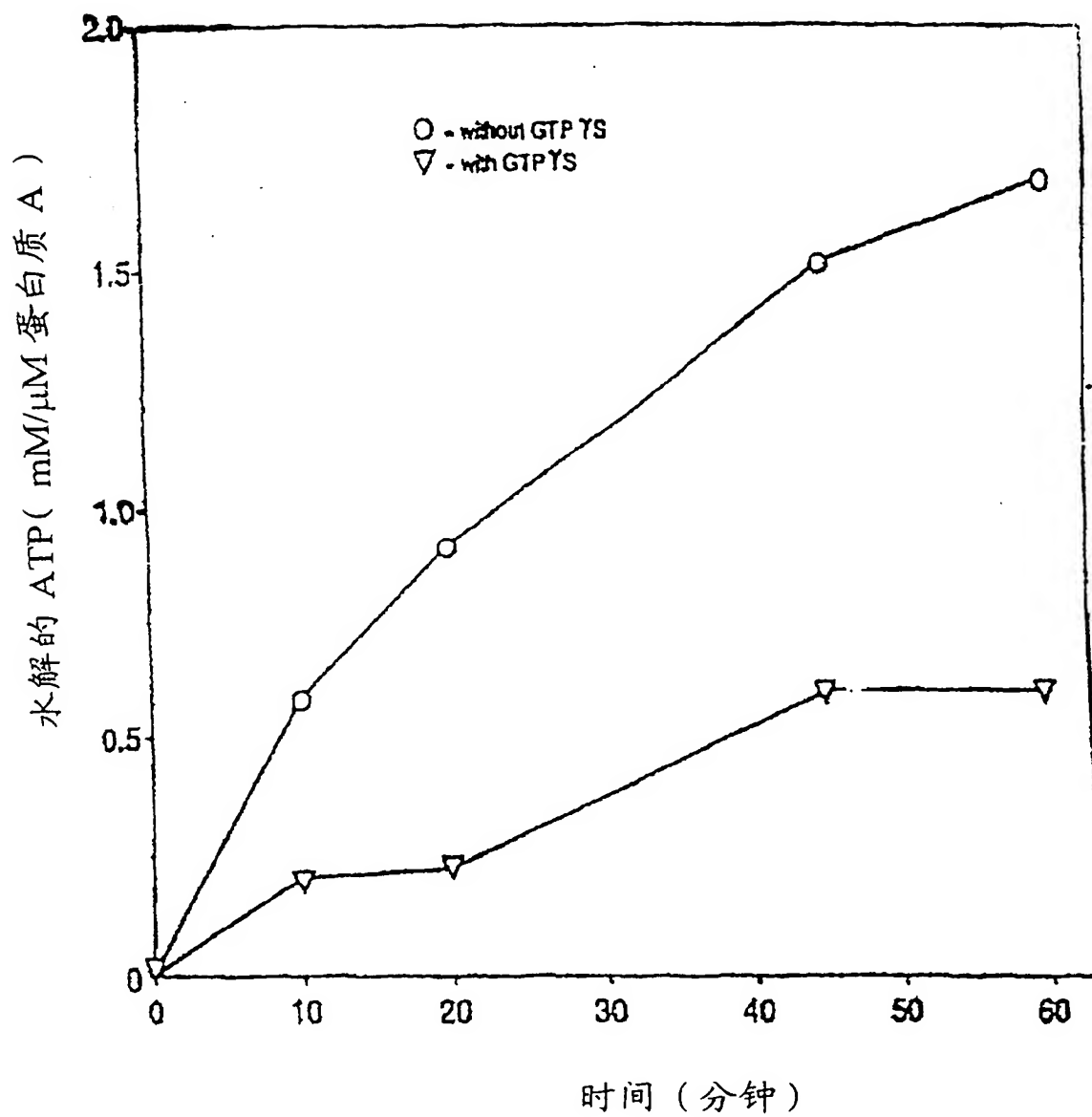


图 4

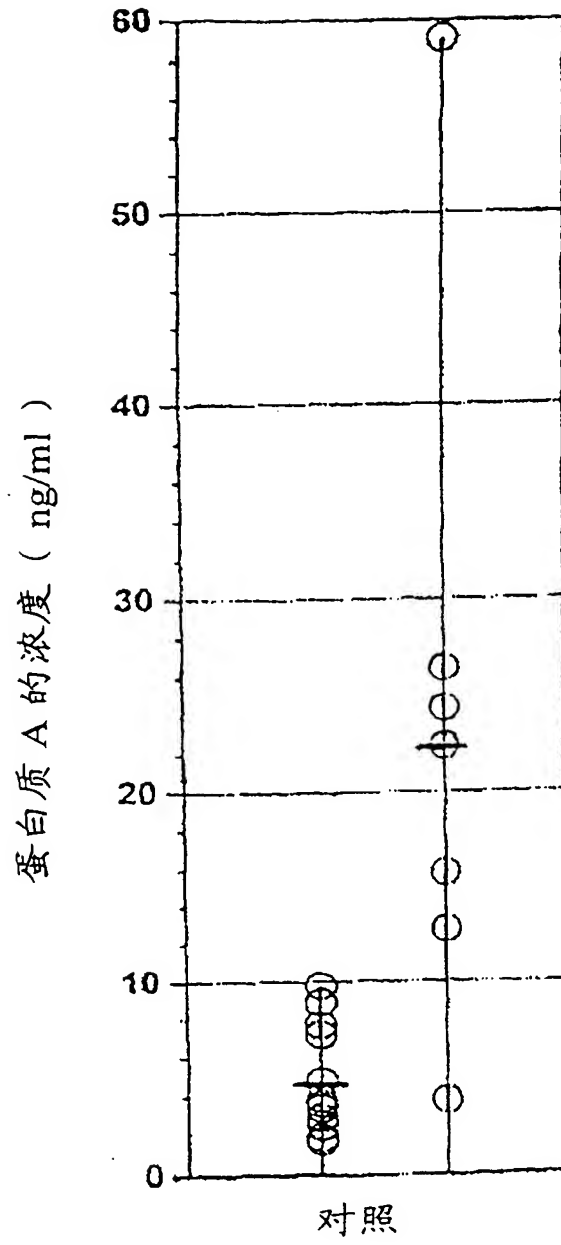


图 5

说明书

以蛋白质 A 对癌症的诊断

本发明的背景技术

对患者进行癌症诊断仍然是难题之一。虽然已经存在有血液或组织中可检测的某些诊断标记物，例如，癌胚胎抗原（CEA）、
5 α 胎儿蛋白（AFP）、以及前列腺特异性抗原（PSA）等，但是，迄今为
止，使用这些标记物对患者身上存在癌症的预测性检测都还没有达到其他临床诊断的准确程度。这些检测的敏感性和特异性都低的令人失望。目前，可以被接受的癌症诊断方法还是那些
10 费时且费力的临床诊断（例如，触诊、X-线照片、乳房 X-线照片、活组织检查）。因此，就存在着对这样一种标记物的需要，即这种标记物优选存在于生物样品中，例如，人体的血液中，并且能够指示人体中癌的存在。特别需要的是，可以对人体早期癌症给以指示的标记物和检测方法。一旦这种检测试验成为可能，就可以进行比现在更为早期的治疗并得到更好的结果。

15 本发明的一个目的是提供利用癌症诊断性蛋白质的测定对个体的原发性和转移性癌症进行诊断的方法。提供用于对个体的原发性和转移性癌症进行诊断的组合物也是本发明的目的之一。

本发明的概述

本发明涉及利用对个体的生物学样品，例如，血液样品进行检测的结果来探察癌症的方法。在这类检测中，使用至少一种对
20 可能存在于生物学样品中的癌症诊断性蛋白质发生免疫反应的抗体。对在癌症诊断性蛋白质：抗体反应中形成的免疫学共轭物进